

Biểu hiện, tinh chế Pediocin tái tổ hợp từ nấm men *Pichia pastoris* X33::*ped* và thử ứng dụng bảo quản tôm

Expression, purification and application of recombinant Pediocin from *Pichia pastoris* X33::*ped* in shrimp preservation trial

Nguyễn Phạm Anh Thư^{1,2}, Đặng Thị Phương Thảo^{1,2}, Nguyễn Hiếu Nghĩa^{1,2*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: nghnghia@hcmus.edu.vn

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.19.1.2878.2024

Ngày nhận: 27/07/2023

Ngày nhận lại: 17/08/2023

Duyệt đăng: 21/08/2023

Từ khóa:

bacteriocin; *Listeria*
monocytogenes; Pediocin PA-
1; *Pichia pastoris* X33

Keywords:

bacteriocin; *Listeria*
monocytogenes; Pediocin PA-
1; *Pichia pastoris* X33

TÓM TẮT

Pediocin là một bacteriocin có kích thước 4.6 kDa, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên *Listeria monocytogenes* và nhiều chủng Gram dương khác. Nhằm thu nhận pediocin với hiệu quả và độ tinh sạch cao cho mục tiêu ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành biểu hiện pediocin tái tổ hợp từ nấm men *Pichia pastoris* X33::*ped*; tinh chế và thử ứng dụng pediocin để bảo quản tôm. Kết quả thực nghiệm cho thấy 1% là nồng độ methanol cảm ứng chủng *P. pastoris* X33::*ped* biểu hiện pediocin tốt nhất. Pediocin tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công từ *P. pastoris* X33::*ped* sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường BSM với đơn vị hoạt tính của dịch nuôi cấy là 6,400 AU/mL. Quy trình tinh chế pediocin trên cột SP-FF được thiết lập thành công với tốc độ nạp mẫu 155.9 cm/h. Pediocin thu nhận được có độ tinh sạch là 91.7%, lượng pediocin thu nhận được từ 1L dịch nuôi cấy đạt 11.0mg. Pediocin tái tổ hợp thu được có khả năng bảo quản tôm ở 4°C trong 07 ngày. Các kết quả của nghiên cứu này là nền tảng khoa học khẳng định tiềm năng sản xuất pediocin tái tổ hợp từ nấm men *P. pastoris* X33::*ped* và ứng dụng trong bảo quản thực phẩm.

ABSTRACT

Pediocin (Ped) is a 4.6kDa bacteriocin effective against *Listeria monocytogenes* and several Gram-positive bacteria. To produce purified Ped with high yield and apply it to food preservation, this study expresses and purifies recombinant Ped (rPed) from *Pichia pastoris* X33::*ped*, and preliminary applies it in shrimp preservation. The results showed that methanol 1% is optimal for inducing the expression of rPed from *P. pastoris* X33::*ped*, achieving 6,400 AU/ml of rPed after 72 hours of yeast culture on a BSM medium. The rPed purification process was successfully established with a sample loading rate of 155.9 cm/h. This process yielded rPed with 91.7% purity and 11.0 mg per liter of culture. This rPed could preserve shrimp at 4°C for 07 days. Therefore, these results demonstrate the potential of producing rPed from *Pichia pastoris* X33::*ped* and applying it in food preservation.

1. Giới thiệu

Pediocin là một bacteriocin thuộc phân lớp IIa, kích thước nhỏ và bền nhiệt, được phân lập lần đầu tiên từ vi khuẩn Gram dương *Pediococcus acidilactici* H. Như các peptide kháng khuẩn lớp IIa khác, pediocin bền với nhiệt và pH. Hoạt tính kháng khuẩn của pediocin không bị ảnh hưởng khi xử lý với nhiệt độ 80°C trong 60 phút và 100°C trong 10 phút (Henderson, Chopko, & van Wassenaar, 1992). Đặc trưng lớn nhất pediocin PA-1 là phổ kháng khuẩn rộng đối với vi khuẩn Gram dương, trong đó có *Listeria monocytogenes*- một vi khuẩn gây bệnh và khó kiểm soát trong thực phẩm. Phụ nữ mang thai, trẻ em, người già hoặc những cá nhân có hệ miễn dịch yếu là những đối tượng dễ nhiễm *Listeria*, trường hợp nghiêm trọng, có thể dẫn đến nhiễm trùng máu, viêm màng não và thậm chí tử vong. Bên cạnh *Listeria*, pediocin cũng có phổ kháng rộng trên nhiều chủng vi sinh vật khác, chủ yếu là Gram dương như *Pediococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, *Propionibacteria*, *Bacilli*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Listeria clostridia*, *Listeria innocua* (López-Cuellar, Rodríguez-Hernández, & Chavarría-Hernández, 2016; Pucci, Vedamuthu, Kunka, & Vandenberg, 1988).

Khả năng kháng nhiều vi khuẩn Gram dương, đặc biệt là kháng mạnh *L. monocytogenes* cho thấy tiềm năng ứng dụng của pediocin PA-1 trong bảo quản thực phẩm. Pediocin đã được sản xuất thương mại dưới tên gọi là “ALTA 2341” và được sử dụng ở Hoa Kỳ và các nước châu Âu như một chất bảo quản đặc biệt trong các sản phẩm thịt để ức chế sự phát triển của *L. monocytogenes* (López-Cuellar & ctg., 2016; Niamah, 2018). Pediocin được bổ sung trong quá trình chế biến có thể làm giảm khả năng nhiễm vi khuẩn gây bệnh ở sản phẩm cuối. Pediocin sản xuất từ *Pediococcus pentosaceus* được bổ sung vào lớp màng bao và dùng như phương pháp thay thế các phương pháp truyền thống để bảo quản trái cây (Narsaiah & ctg., 2015). Tương tự, nghiên cứu của Yousef và cộng sự năm 1991 cho thấy cả vi khuẩn *Pediococcus acidilactici* PA1.0 và pediocin sau khi được thu nhận và tinh sạch đều có khả năng làm giảm đáng kể mật độ của 03 chủng *Listeria* ở xúc xích (Yousef, Luchansky, Degnan, & Doyle, 1991). Kết quả nghiên cứu tương tự cũng cho thấy pediocin ở nồng độ 1,350 AU/mL làm giảm mật độ *L. monocytogenes* ScottA, *L. monocytogenes* Ohio2 và *L. ivanovii* ATCC 19119 (Schlyter, Glass, Loeffelholz, Degnan, & Luchansky, 1993). Bên cạnh bảo quản thịt và các sản phẩm làm từ thịt, pediocin còn được sử dụng trong bảo quản sữa và các sản phẩm liên quan.

Ngoài khả năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, pediocin còn được đánh giá có tiềm năng lớn trong việc tiêu diệt tế bào ung thư. Nghiên cứu trên dòng tế bào ung thư phổi A-549 và các dòng tế bào ung thư biểu mô đại tràng cho thấy tế bào ung thư chết khi tiếp xúc với pediocin ở nồng độ thấp. Pediocin K2a2-3 (Chakrabarty & Fialho, 2019), được phân lập từ *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 cho thấy khả năng gây độc đối với tế bào ung thư biểu mô đại tràng HT29 và tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (Villarante & ctg., 2011).

Mong muốn tạo ra pediocin có hoạt tính kháng khuẩn mạnh, độ tinh sạch cao, giá cả cạnh tranh đã thúc đẩy các nghiên cứu sản xuất pediocin trên các hệ thống tế bào chủ khác nhau. Năm 2005, Moon, Pyun, và Kim lần đầu tiên phân lập *P. acidilactici* K10 từ kim chi, sau đó đã biểu hiện thành công pediocin PA-1 tái tổ hợp có gắn đuôi His-tag ở hệ thống *E. coli* (Moon & ctg., 2005). Schoeman và cộng sự đã nghiên cứu tính khả thi của việc kiểm soát vi khuẩn gây hư hỏng, trong quá trình lên men dựa vào nấm men, bằng cách biểu hiện pediocin PA-1 trên hệ thống *Saccharomyces cerevisiae* (Schoeman, Vivier, du Toit, Dicks, & Pretorius, 1999). Kết quả nghiên cứu cho thấy, pediocin được thu nhận đúng với kích thước tự nhiên, có khả năng kháng lại chủng *L. monocytogenes* B73, tuy nhiên nồng độ biểu hiện khá thấp. Năm 2005, Beaulieu và cộng sự đã

biểu hiện và tinh sạch pediocin PA-1 ở hệ thống nấm men *P. pastoris*. Tuy nhiên, pediocin PA-1 tái tổ hợp thu được không có hoạt tính sinh học, pediocin thu nhận có kích thước không đúng với kích thước tự nhiên (Beaulieu & ctg., 2005). Trong nghiên cứu trước đây, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã phát triển thành công dòng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp (*P. pastoris* X33::*ped*) có khả năng biểu hiện pediocin có hoạt tính kháng *L. monocytogenes*. Phát triển thành công dòng nấm men *P. pastoris* X33::*ped* biểu hiện pediocin có hoạt tính là kết nghiên cứu đầu tiên được ghi nhận trên thế giới và kết quả này đã được chúng tôi đăng ký bảo hộ sáng chế tại Hoa Kỳ (Dang, Nguyen, Nguyen, Tran, & Nguyen, 2021). Do vậy, để kiểm tra tiềm năng ứng dụng pediocin tái tổ hợp từ *P. pastoris*, trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng đến việc thu nhận, tinh chế và thử ứng dụng pediocin tái tổ hợp có hoạt tính từ nấm men *P. pastoris* X33::*ped*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Môi trường và chủng vi sinh vật

Môi trường Basalt Salt Medium (BSM) có bổ sung 1% glycerol hoặc 1% methanol [14] được sử dụng trong biểu hiện pediocin từ nấm men. Môi trường Tryptone Soya Broth (TSB) và Tryptone Soya Agar (TSA) dùng trong nuôi cấy *L. monocytogenes*. Chủng nấm men *P. pastoris* X33 có khả năng biểu hiện pediocin (*P. pastoris* X33::*ped*) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học Phân Tử, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh dùng để biểu hiện pediocin tái tổ hợp. Theo đó, gene mã hoá cho peptide pediocin dưới sự điều hoà của promoter AOX1 được sát nhập vào bộ gene của tế bào nấm men *P. pastoris* X33. Chủng chỉ thị *L. monocytogenes* ATCC 13932 được dùng để thử hoạt tính kháng khuẩn.

2.2. Khảo sát nồng độ methanol cảm ứng biểu hiện pediocin từ *P. pastoris* X33::*ped*

Ở nấm men *P. pastoris*, khi gene mã hoá cho protein tái tổ hợp được biểu hiện dưới sự điều khiển của promoter AOX1, methanol là một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự biểu hiện của protein này. Trong nghiên cứu này, nấm men *P. pastoris* được biểu hiện trong các môi trường cảm ứng bởi methanol với các nồng độ cuối 0.5%; 1%; 1.5%; 2% để xác định nồng độ methanol tối ưu nhất cho việc biểu hiện protein của nấm men.

Khuẩn lạc nấm men *P. pastoris* được hoạt hóa trong ống nghiệm chứa 5ml môi trường Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) bổ sung zeocin (nồng độ cuối là 100 mg/ml), lắc ở 30°C, 250rpm trong 16 - 18 giờ sau đó cấy chuyển qua ống nghiệm chứa 5mL môi trường BSM glycerol 1% để tăng sinh khối. Sau khoảng 16 - 20 giờ, nấm men trong BSM glycerol được cấy chuyển qua bình chứa 100mL môi trường BSM methanol với nồng độ methanol xác định (tùy thí nghiệm) sao cho OD_{600nm} khởi điểm xấp xỉ 1.0. Sau mỗi 24 giờ thu 1mL dịch nuôi cấy, đo OD_{600nm} và xác định hoạt tính kháng khuẩn, đơn vị hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy; đồng thời bổ sung trực tiếp 1mL methanol ở nồng độ xác định (tùy thuộc thí nghiệm) vào môi trường nuôi cấy để đảm bảo nồng độ cuối của methanol trong môi trường là nồng độ methanol khảo sát. Thu toàn bộ mẫu ở 72 hoặc 96 giờ. Ảnh hưởng của nồng độ methanol đến sự biểu hiện pediocin của *P. pastoris* được đánh giá thông qua sự tăng trưởng của nấm men thể hiện ở đường cong tăng trưởng và hoạt tính của pediocin thể hiện qua khả năng kháng khuẩn trên chủng vi khuẩn chỉ thị.

2.3. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của pediocin tái tổ hợp

Hoạt tính kháng khuẩn của pediocin tái tổ hợp được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, tham khảo từ công bố trước đó (Schoeman & ctg., 1999), với một số thay đổi như sau: Hoạt hóa chủng vi khuẩn *L. monocytogenes* ATCC 13932 trong 5mL môi trường TSB, nuôi cấy lắc trong 16 giờ, cấy chuyển với tỷ lệ 1/10 (v/v) sang môi trường TSB trong 01 - 02 giờ, đo

mật độ quang ở bước sóng 600nm và pha loãng về khoảng $OD_{600} = 0.1 - 0.2$. Chuẩn bị các đĩa TSA 2% agar. Chuẩn bị môi trường TSA 1% agar dạng lỏng, để nguội đến khoảng nhiệt độ 40 - 45°C và thêm vi khuẩn với tỷ lệ TSA-1%: Vi khuẩn = 50:1, đổ một lớp 5mL lên các đĩa TSA 2%. Đợi đĩa đông lại và đục các lỗ thạch với đường kính 0.8cm.

Đơn vị hoạt tính đối với *L. monocytogenes* của pediocin tái tổ hợp được xác định dựa trên bậc pha loãng lớn nhất mà tại đó hiệu số đường kính kháng khuẩn trừ đường kính lỗ thạch vẫn lớn hơn hoặc bằng 2mm (Moon & ctg., 2005). Pediocin tái tổ hợp được pha loãng bậc 2 bằng dung dịch đệm B, bổ sung vào lỗ thạch. Ủ đĩa ở 37°C, qua đêm; đo đường kính vòng kháng khuẩn ở các bậc pha loãng; xác định bậc pha loãng lớn nhất còn hoạt tính kháng khuẩn với hiệu số đường kính kháng khuẩn ≥ 2 mm. Đơn vị hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo Moon và cộng sự (2005) bằng các công thức sau:

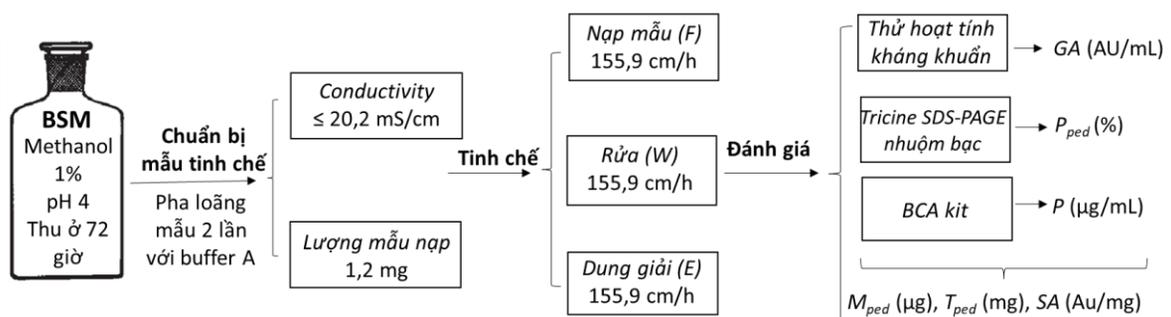
$$GA = \frac{2^n \times 1000}{V} \quad (1)$$

$$SA = \frac{GA}{C_{ped}} \quad (2)$$

Trong đó, GA là hoạt tính kháng khuẩn chung (AU/mL), SA là hoạt tính kháng khuẩn riêng (AU/mg), n là hệ số pha loãng, V là thể tích dịch thử hoạt tính (50 μ L), C_{ped} là nồng độ pediocin (mg/mL). Mỗi kết quả thử hoạt tính được lặp lại 03 lần, xử lý thống kê và thể hiện kết quả dưới dạng mean \pm SEM.

2.4. Phương pháp tinh chế pediocin bằng sắc ký trao đổi cation

Dịch môi trường sau khi thu nhận sẽ được pha loãng bậc 2 với đệm A (CH_3COONa 25mM pH 4) và chỉnh về pH 4. Cột sắc ký trao đổi cation SP FF 1mL (GE Healthcare Life Sciences) được cân bằng với đệm A sau đó tiến hành nạp mẫu với tốc độ 1 mL/phút. Sau khi toàn bộ mẫu đã được nạp, tiến hành rửa cột với 100% đệm A nhằm loại bỏ các protein tạp bám trên cột, sau đó protein mục tiêu được dung giải ở 60% đệm B (CH_3COONa 25mM pH 4, NaCl 1M). Các phân đoạn sau tinh chế được tiến hành điện di Tricine - SDS-PAGE, nhuộm bạc và thử hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán lỗ thạch.



Hình 1. Quy trình tinh chế và đánh giá pediocin tái tổ hợp

2.5. Khảo sát ảnh hưởng tốc độ dòng chảy đến hiệu quả tinh chế pediocin bằng cột Hitrap SP-FF 1mL

Dịch nuôi cấy nấm men được pha loãng với hệ đệm A để đạt độ dẫn điện trong khoảng 20 - 35 mS/cm cho quá trình bám cột và nạp mẫu ở các tốc độ dòng thể tích lần lượt là 1 mL/phút, 2 mL/phút, 3 mL/phút và 4 mL/phút tương ứng với các tốc độ dòng tuyến tính là 155.9 cm/h; 311.9 cm/h; 467.7 cm/h và 623.9 cm/h. Tính lượng protein tổng đã nạp lên cột. Rửa và dung giải mẫu ở 60% B với tốc độ 1 mL/phút (155.9 cm/h). Sản phẩm protein sau tinh chế được thử hoạt tính trên

chủng vi khuẩn chỉ thị để tính độ thu hồi, đo nồng độ bằng bộ kit phân tích protein BCA (Thermo Fisher Scientific) và điện di Tricine-SDS-PAGE, nhuộm bạc. Quy trình được lặp lại 03 lần.

Để xác định tốc độ dòng chảy, công thức chuyển từ dòng chảy tuyến tính sang dòng chảy thể tích đã được tham khảo theo hướng dẫn nhà sản xuất cột sắc ký trao đổi cation SP FF 1mL (GE Healthcare Life Sciences) như sau:

$$F = \frac{Y}{60} \times \pi r^2 \quad (3)$$

Trong đó, F là tốc độ dòng thể tích (mL/phút), Y là tốc độ dòng chảy tuyến tính (cm/h), r là bán kính trong cột (cm).

Dựa trên nồng độ và độ tinh sạch pediocin sau tinh chế, chúng tôi đã xác định hiệu quả thu nhận pediocin theo công thức sau:

$$M_{ped} = P \times P_{ped} \times V \quad (4)$$

$$T_{ped} = M_{ped} \times \frac{1000}{15} \quad (5)$$

Trong đó, M_{ped} là lượng pediocin thu nhận từ 15mL dịch nuôi cấy (mg), T_{ped} là tổng lượng pediocin thu nhận từ 1L dịch nuôi cấy (mg), P là nồng độ protein tổng ($\mu\text{g/mL}$), P_{ped} là độ tinh sạch pediocin (%), được phân tích thông qua gel tricine SDS-PAGE bằng phần mềm gel anazaler, V là thể tích dịch chứa pediocin thu được sau khi tinh chế (mL).

2.6. Thử nghiệm ứng dụng pediocin trong bảo quản tôm

Tôm được mua tại siêu thị COOP Food, được lựa chọn theo tiêu chuẩn tôm đông lạnh xuất khẩu loại 01 (TCVN 5835 - 1994 về tôm thịt đông lạnh IQF xuất khẩu (Viện Tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam, 1994)). Thân tôm nguyên vẹn không ô nhiễm, sạch ruột. Vỏ cứng tự nhiên (cho phép không quá 5% số tôm có vết vỡ trên vỏ, vết vỡ không quá 1/3 chu vi đốt). Màu tự nhiên của tôm tươi, sáng bóng, không có đốm đen. Mùi đặc trưng của tôm tươi, thịt đàn hồi, sau khi luộc thịt tôm săn, chắc, vị ngọt, mùi thơm, nước luộc trong.

Chuẩn bị 500g tôm tươi, 71 - 90 con/kg, rửa sạch, kiểm tra tổng số vi sinh vật hiếu khí (ngày 0). Tiến hành nhúng 1/3 số tôm vào dung dịch chứa pediocin 6,400 AU/mL sao cho ngập toàn bộ trong 01 phút, ở nhiệt độ phòng (25°C). Vớt tôm ra, đặt 02 con tôm (22 - 24g) vào từng túi zip riêng biệt. Tiến hành song song với mẫu đối chứng 01 (không ngâm tôm trong dung dịch pediocin hay dung dịch đệm B) và mẫu đối chứng 02 (ngâm tôm với đệm B - CH_3COONa 25mM pH 4, NaCl 1M). Bảo quản tôm ở 4°C trong 01 tuần, cứ sau mỗi 01 ngày lấy 10g tôm trong 01 túi zip để tiến hành kiểm tra tổng số vi sinh vật hiếu khí (phần tôm còn lại trong túi zip bỏ đi).

Quy trình kiểm định tổng vi sinh vật hiếu khí được tiến hành như sau: lấy 10g mẫu tôm bỏ vào túi dập mẫu, thêm dung dịch pha loãng cho đủ 100mL; hút 1mL pha loãng bậc 10 đến 10⁻⁴. Sử dụng 1mL dịch huyền phù của độ pha loãng 10⁻³ và 10⁻⁴ nhỏ vào petrifilm (3M™ PETRIFILM™ 6406), mỗi độ pha loãng 2 đĩa. Ghi chú và ủ đĩa ở 30°C trong 72 giờ. Tổng số vi sinh vật hiếu khí C (CFU/g) được xác định theo tiêu chuẩn TCVN 9977:2013 (Viện Tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam, 2013) và tính bằng công thức sau:

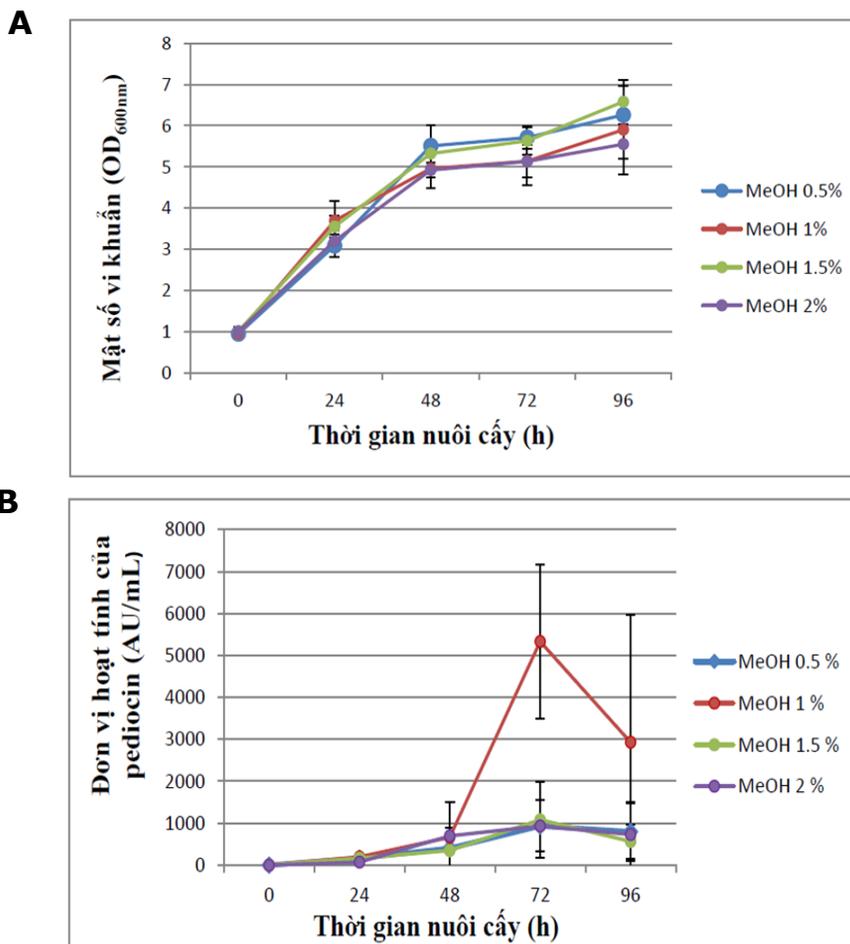
$$C = \frac{N \times 100}{(n_1 \times 10^{-3} + n_2 \times 10^{-4}) \times 10} \quad (6)$$

Trong đó, C là tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/g), N là tổng số khuẩn lạc đếm ở các đĩa, n_i là số đĩa thực nghiệm ở mỗi nồng độ đếm.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ methanol trong nuôi cấy biểu hiện pediocin tái tổ hợp từ *P. pastoris* X33::ped

Methanol đóng vai trò là nguồn carbon duy nhất, đồng thời là chất cảm ứng cho sự biểu hiện protein/peptide tái tổ hợp ở nấm men *P. pastoris* với hệ thống promoter AOX1, vì vậy nồng độ methanol được coi là một trong những yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả sản xuất protein tái tổ hợp ở hệ thống này (Khatri & Hoffmann, 2006). Trước khi đánh giá tác động của nồng độ methanol lên mức độ biểu hiện protein mục tiêu, chủng nấm men tái tổ hợp phải được chứng minh có thể tăng trưởng bình thường trong các nồng độ methanol cần khảo sát. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp được nuôi cấy trong 96h ở các điều kiện môi trường có nồng độ methanol cảm ứng khác nhau. Kết quả khảo sát tăng trưởng của nấm men cho thấy ở các nồng độ methanol 0.5%; 1%; 1.5%; 2%, đường cong tăng trưởng của nấm men không có sự khác biệt có ý nghĩa. Cụ thể, trong khoảng thời gian từ 0 giờ đến 48 giờ, nấm men tăng trưởng mạnh, sau đó tăng trưởng chậm hơn ở các giai đoạn từ 48 giờ đến 96 giờ. Sự tăng trưởng khá đồng đều này cho thấy *P. pastoris* X33::ped tăng trưởng ổn định trong điều kiện các nồng độ methanol đã khảo sát (Hình 2A).



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ methanol trong nuôi cấy biểu hiện pediocin tái tổ hợp

(A) Đường cong tăng trưởng của nấm men *P. pastoris* trong môi trường BSM với các nồng độ methanol khác nhau (0.5; 1; 1.5; 2%)

(B) Đơn vị hoạt tính kháng *L. monocytogenes* ATCC 13932 của pediocin theo thời gian nuôi cấy

Ngoài việc sử dụng methanol làm nguồn dinh dưỡng đáp ứng cho sự tăng trưởng, nấm men còn sử dụng methanol như một chất cảm ứng để biểu hiện peptide pediocin dưới sự điều hoà của promoter AOX1. Mức độ biểu hiện pediocin ở các nồng độ methanol khác nhau theo thời gian cũng được ghi nhận thông qua đơn vị hoạt tính kháng *L. monocytogenes* của dịch nuôi cấy (**Hình 2B**). Kết quả ghi nhận được ở **Hình 2B** cho thấy đơn vị hoạt tính của pediocin trong môi trường nuôi cấy nấm men có các nồng độ methanol khác nhau đều có xu hướng tăng trong khoảng thời gian từ 0h đến 72 giờ, sau đó bắt đầu giảm. Đơn vị hoạt tính cao nhất đạt 5,333 AU/mL tại thời điểm 72 giờ ở nồng độ methanol khảo sát là 1%.

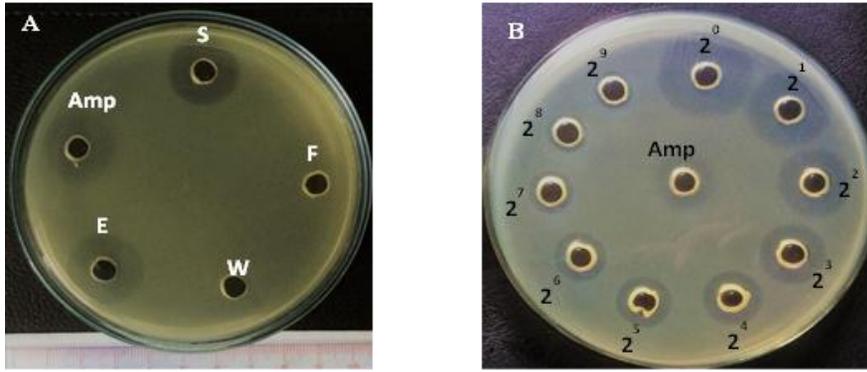
Đánh giá sự tương quan giữa đường cong tăng trưởng của nấm men và đơn vị hoạt tính của pediocin cho thấy trước thời điểm biểu hiện 48h, hoạt tính pediocin không cao. Hay nói cách khác, có thể nói lượng pediocin tiết ra môi trường không nhiều, điều này được giải thích do trong khoảng thời gian này nấm men đang thích nghi với môi trường và tập trung nguồn methanol cho sự tăng trưởng. Sau khi đạt được sự tăng trưởng cần thiết, nấm men bắt đầu biểu hiện pediocin mạnh hơn trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ. Sau 72 giờ, đường cong tăng trưởng của nấm men cho thấy mật số tế bào có xu hướng ổn định cho đến thời điểm 96 giờ. Trong giai đoạn này, bên cạnh những tế bào nấm men mới được sinh ra, một số tế bào nấm men đã đến giai đoạn suy thoái và chết đi. Các tế bào nấm men chết và giải phóng protease ra môi trường nuôi cấy, protease này có thể phân huỷ các protein peptide tái tổ hợp mục tiêu trong quá trình sản xuất protein/peptide tái tổ hợp (Jahic, Gustavsson, Jansen, Martinelle, & Enfors, 2003; Zhang, Liu, & Wu, 2007). Điều này gợi ý nguyên nhân việc suy giảm hoạt tính kháng khuẩn của peptide pediocin như ghi nhận ở **Hình 2B**. Với các kết quả thu được, chúng tôi bước đầu đưa ra kết luận: nồng độ methanol 1% và thời gian 72 giờ là các thông số được chọn và áp dụng trong quá trình biểu hiện để thu nhận được pediocin có hoạt tính kháng khuẩn.

3.2. Khảo sát điều kiện tinh chế pediocin tái tổ hợp

3.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường BSM đến hiệu quả tinh chế pediocin

Như đã nói trên, chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện pediocin có hoạt tính từ nấm men *P. pastoris* trên môi trường BSM. Pediocin tái tổ hợp được thu nhận trong môi trường BSM sau khi nuôi cấy nấm men. Đây là môi trường được ứng dụng nhiều trong các quy trình lên men *P. pastoris* giúp tăng hiệu quả thu nhận protein mục tiêu (Hellwig & ctg., 2001). Tuy nhiên, BSM là môi trường có hàm lượng muối khoáng cao, pediocin được thu nhận trực tiếp trong môi trường sau nuôi cấy nấm men, do vậy giả thiết được đặt ra rằng hàm lượng muối trong môi trường có khả năng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả tinh chế do sự cạnh tranh bám với các phối tử ion trên pha tĩnh. Do vậy, trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của môi trường BSM đến hiệu quả tinh chế pediocin đã được kiểm tra. Chúng tôi tiến hành tinh chế sơ khởi mẫu biểu hiện với các tốc độ dòng thể tích là 1 mL/phút, mẫu đã pha loãng với đệm cân bằng A với các tỷ lệ pha loãng lần lượt 02, 03 và 04 lần. Tốc độ dòng thể tích là 1 mL/phút và dung dịch protein sau khi qua cột (dung dịch F) đã được thu nhận để kiểm tra sự hiện diện của pediocin thông qua hoạt tính kháng khuẩn của peptide.

Chúng tôi đã ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn trong dịch qua cột khi không pha loãng mẫu, ngược lại, khi pha loãng mẫu 02 - 04 lần, đã không ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn. Do vậy, mẫu đã được pha loãng 02 lần trong đệm A để nghiên cứu thu nhận pediocin. Sau đó, chúng tôi đã tiến hành tinh chế với điều kiện mẫu pha loãng 02 lần, tốc độ dòng cố định 1 mL/phút. Dung dịch protein sau khi qua cột (dung dịch F) và dung dịch rửa cột (dung dịch W) đã được thu nhận để kiểm tra sự hiện diện của pediocin thông qua hoạt tính kháng khuẩn của peptide này.



Hình 3. Tinh chế pediocin từ dịch nuôi cấy trên môi trường BSM

(A) Kết quả thử hoạt tính các phân đoạn sau tinh chế thu nhận pediocin từ dịch biểu hiện môi trường BSM trên chủng chỉ thị *L. monocytogenes*. S: dịch lên men, F: dịch qua cột, W: dịch rửa cột, E: dịch dung giải cột

(B) Kết quả đánh giá đơn vị hoạt tính phân đoạn dung giải trên chủng chỉ thị *L. monocytogenes*. 2n: độ pha loãng bậc 02 của dịch nuôi cấy nấm men. Amp: Chứng dương, ampicillin nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$. Đường kính các lỗ thạch là 0.8cm

Kết quả (**Hình 3A**) cho thấy dịch nuôi cấy nấm men *P. pastoris* X33 chứa pediocin tái tổ hợp thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *L. monocytogenes* ATCC 13932. Sau khi dịch này qua cột Hitrap SP-FF 1mL (GE Healthcare), dung dịch qua cột F không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Tương tự như vậy, dịch rửa cột W cũng không cho hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả này cho thấy pediocin tái tổ hợp đã được bám trên cột tinh chế một cách hiệu quả. Kết quả này cũng chứng tỏ môi trường với hàm lượng muối khoáng cao BSM, trong trường hợp này, không ảnh hưởng đến hiệu quả bám cột của mẫu tinh chế. Bên cạnh đó, dịch dung giải (E) pediocin tái tổ hợp thể hiện hoạt tính kháng khuẩn *Listeria* với hoạt tính chung là 6,400 AU/mL (**Hình 3B**).

3.2.2. Khảo sát tốc độ dòng tối ưu ở cột Hitrap SP-FF 1mL

Chúng tôi tiến hành nạp mẫu đã pha loãng với đệm cân bằng để độ dẫn điện ≤ 20.2 mS/cm, tương ứng với 1.2mg protein tổng nồng độ 40 $\mu\text{g/mL}$ với các tốc độ dòng thể tích lần lượt là 1 mL/phút; 2 mL/phút; 3 mL/phút và 4 mL/phút, thu các phân đoạn qua cột (Flow through) và dung dịch với tốc độ 1 mL/phút.

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn cho thấy khi tăng tốc độ dòng ở giai đoạn nạp mẫu đến tốc độ 4 mL/phút thì xuất hiện hoạt tính kháng khuẩn ở các phân đoạn qua cột (**Bảng 1**). Như vậy, ở tốc độ dòng chảy 4 mL/phút các phân tử peptide mục tiêu chưa đủ thời gian tương tác với các phân tử tích điện trên cột, cũng như lực chảy mạnh dẫn đến một số phân tử peptide bám tạm thời trên cột với lực tương tác yếu dễ bị rửa trôi ra khỏi cột.

Bảng 1

Tóm tắt kết quả tinh chế pediocin ở bốn tốc độ dòng nạp mẫu

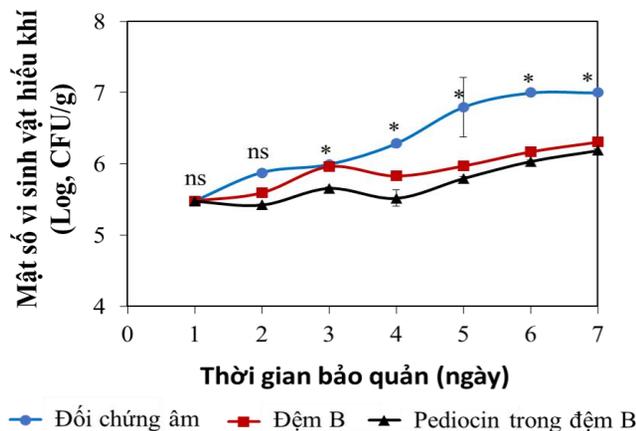
Mẫu*	V (mL)	P ($\mu\text{g/mL}$)	P _{ped} (%)	M _{ped} (μg)	T _{ped} (mg)	GA (AU/mL)	SA ($\times 10^4$ AU/mg)
S	15	57.60 \pm 1.0	-	-	-	6,400	-
E ₁	3.5	51.60 \pm 1.3	91.7	165.5	11.0	6,400	13.5
E ₂	3.5	53.60 \pm 1.6	82.7	155.1	10.3	6,400	14.4
E ₃	3.5	61.60 \pm 1.4	74.3	160.3	10.7	6,400	14.0
E ₄	3.5	59.60 \pm 0.9	78.2	163.1	10.9	800	1.7

*S là mẫu dịch nuôi cấy nấm men trước khi qua cột; E₁, E₂, E₃ và E₄ tương ứng là mẫu pediocin dịch dung ly được tinh chế ở các điều kiện tốc độ nạp mẫu lần lượt 1; 2; 3 và 4 mL/phút

Kết quả trình bày trên **Bảng 1** cho thấy, 03 vận tốc nạp mẫu 1 mL/phút; 2 mL/phút và 3 mL/phút đều cho hoạt tính phân đoạn dung giải cao bằng nhau, đơn vị hoạt tính chung đạt 6,400 AU/mL, đơn vị hoạt tính riêng 13 - 14 × 10⁴ AU/mg. Trong đó vận tốc nạp mẫu 1 ml/phút (155.9 cm/h) cho lượng protein thu nhận cao nhất 11.0mg từ 1L dung dịch nuôi cấy; độ tinh sạch cao nhất 91.7%. Kết quả tinh chế này khả quan hơn so với nghiên cứu của Moon, Pyun, và Kim (2006) khi tinh chế pediocin từ tế bào chủ là *E. coli* M15 (Moon & ctg., 2006); lượng thu được từ 1L dung dịch là 0.06mg; đơn vị hoạt tính chung chỉ đạt 3,000 AU/mL và độ tinh sạch không được các tác giả đề cập trong công bố. Năm 2005, Beaulieu và cộng sự thu được 74mg pediocin trong 1L dịch nuôi cấy (gấp hơn 6.5 lần nghiên cứu này) nhưng pediocin thể hiện ở nhiều kích thước khác nhau không đúng 4.6kDa và pediocin không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên chủng chỉ thị *Listeria monocytogenes* (Beaulieu & ctg., 2005). Từ các kết quả nghiên cứu, quy trình tinh chế từ nấm men *P. pastoris* X33::ped được thiết lập bao gồm (1) pha loãng 02 lần với đệm để độ dẫn điện (Conductivity) của mẫu là < 20.2 mS/cm, (2) lượng protein tổng nạp mẫu là 1.2mg, (3) tốc độ dòng rửa là 155.9 cm/h và (4) tốc độ dòng dung ly là 155.9 cm/h.

3.3. Thử nghiệm bảo quản tôm bằng pediocin tái tổ hợp

Sau khi tinh chế, peptide tái tổ hợp được sử dụng trong thử nghiệm bảo quản tôm. Chúng tôi thực hiện nghiệm thức bảo quản tôm bằng dung dịch 60% đệm B (dung dịch dung giải pediocin tái tổ hợp) để làm đối chứng. Sau 07 ngày thử nghiệm, tiến hành kiểm tra tổng vi sinh vật hiếu khí và thu nhận kết quả như trình bày trên **Hình 4**.



Hình 4. Kết quả định lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí trên tôm được bảo quản bằng pediocin sau 07 ngày bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Đối chứng âm: không ngâm tôm trong dung dịch pediocin hay dung dịch đệm B. Đệm B: tôm được ngâm trong dung dịch đệm B

Pediocin trong đệm B: tôm được ngâm trong dung dịch pediocin. ns: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô tôm ngâm trong đệm B và lô tôm ngâm trong pediocin ($p > 0.05$) *: có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô tôm ngâm trong đệm B và lô tôm ngâm trong pediocin ($p < 0.05$)

Kết quả thử nghiệm bảo quản cho thấy: tôm bảo quản ở nhiệt độ 4°C không ngâm pediocin có lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí cao hơn so với mẫu pediocin và mẫu đệm ở tất cả thời điểm khảo sát, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p value < 0.05 (two-way ANOVA). Có thể thấy rằng việc xử lý tôm với đệm B cũng cho hiệu quả bảo quản tôm. Hiệu quả này có thể do lượng muối trong đệm B cao (0.6M NaCl). Tuy nhiên, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức xử lý tôm bằng pediocin và tôm xử lý bằng đệm B cũng khẳng định hiệu quả bảo quản của pediocin tái tổ hợp ở 4°C từ ngày 03 đến ngày 07. Mặt khác, thực tế cũng cho thấy các sản phẩm bacteriocin thương mại đều phối trộn với muối nhằm tăng hoạt tính bảo quản (Nisin-Nisaplin, chứa 77.5% NaCl (Jones, Salin, & Williams, 2005)). Đây là kết quả tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm triển khai ứng dụng pediocin trong bảo quản tôm và các hải sản khác.

4. Kết luận

Pediocin PA-1 là bacteriocin có nhiều tiềm năng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm. Đặc biệt là thực phẩm thường hay bị nhiễm bởi *L. monocytogenes* như thịt xông khói, xúc xích, nem chua, trứng, sữa. Vì vậy, pediocin trở thành chủ đề nghiên cứu thu hút nhiều nhà khoa học trên thế giới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc thu nhận pediocin tái tổ từ nấm men *P. pastoris* X33::*ped*; đã xây dựng và đề xuất được quy trình tinh chế pediocin từ dịch nuôi cấy nấm men với hiệu suất 11.0 mg/L; độ tinh sạch 91.7%. Pediocin tái tổ hợp thu được có hiệu quả bảo quản tôm ở 4°C trong 07 ngày. Các kết quả thực nghiệm này cho thấy tiềm năng sản xuất và ứng dụng pediocin tái tổ hợp trong bảo quản thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số GEN-2021-18-01.

Tài liệu tham khảo

- Beaulieu, L., Groleau, D., Miguez, C. B., Jetté, J. F., Aomari, H., & Subirade, M. (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expression and Purification*, 43(2), 111-125. doi:10.1016/j.pep.2005.05.012
- Chakrabarty, A. M., & Fialho, A. M. (2019). Prospective therapeutic applications of bacteriocins as anticancer agents. In L. F. Coelho (Ed.), *Microbial infections and cancer therapy* (pp. 356-358). New York, NY: CRC Press.
- Dang, T. T. P., Nguyen, T. T. M., Nguyen, N. H., Tran, T. L. T., & Nguyen, T. P. A. (2021). *Recombinant Pichia pastoris strain and method for producing active pediocin PA-1*. U.S. Patent Application No. 16/237,684. Truy cập ngày 27/05/2023 tại <https://patents.google.com/patent/US11807856B2/en?q=16%2f237%2c684>
- Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P. G., Henke, M., van der Logt, P., & Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), 344-352. doi:10.1002/bit.1125
- Henderson, J. T., Chopko, A. L., & van Wassenaar, P. D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295(1), 5-12. doi:10.1016/0003-9861(92)90480-K
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M., & Enfors, S. O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 45-53. doi:10.1016/S0168-1656(03)00003-8
- Jones, E., Salin, V., & Williams, G. W. (2005). *Nisin market study phase I: Current commercial bacteriocin market characteristics*. Texas, TX: Texas A&M University.
- Khatri, N. K., & Hoffmann, F. (2006). Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5), 871-879. doi:10.1002/bit.20773
- López-Cuellar, M. del R., Rodríguez-Hernández, A. I., & Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1039-1050. doi:10.1080/13102818.2016.1232605

- Moon, G. S., Pyun, Y. R., & Kim, W. J. (2005). Characterization of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* K10 and expression of his-tagged recombinant pediocin PA-1 in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 403-411.
- Moon, G. S., Pyun, Y. R., & Kim, W. J. (2006). Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 136-140. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.019
- Narsaiah, K., Wilson, R. A., Gokul, K., Mandge, H. M., Jha, S. N., Bhadwal, S., ... Vij, S. (2015). Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 100(2014), 212-218. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.10.003
- Niamah, A. K. (2018). Structure, mode of action and application of pediocin natural antimicrobial food preservative: A review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 31(1), 59-69. doi:10.37077/25200860.2018.76
- Pucci, M. J., Vedamuthu, E. R., Kunka, B. S., & Vandenberg, P. A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2349-2353. doi:10.1128/aem.54.10.2349-2353.1988
- Schlyter, J. H., Glass, K. A., Loeffelholz, J., Degan, A. J., & Luchansky, J. B. (1993). The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *International Journal of Food Microbiology*, 19(4), 271-281.
- Schoeman, H., Vivier, M. A., du Toit, M., Dicks, L. M. T., & Pretorius, I. S. (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(8), 647-656. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19990615)15:8<647::AID-YEA409>3.0.CO;2-5
- Viện Tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam. (1994). *TCVN 5835-1994: Ôm thịt đông lạnh IQF xuất khẩu [TCVN 5835-1994: IQF frozen meat for export]*. Truy cập ngày 27/05/2023 tại <https://tieuchuan.vsqi.gov.vn/tieuchuan/view?sohieu=TCVN+5835%3A1994>
- Viện Tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam. (2013). *TCVN 9977:2013: Thực phẩm - định lượng tổng vi sinh vật hiếu khí bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm petrifilm™ [TCVN 9977:2013: Food - quantification of total aerobic microorganisms using the Petrifilm™ counting plate method]*. Truy cập ngày 27/05/2023 tại <https://tieuchuan.vsqi.gov.vn/tieuchuan/view?sohieu=TCVN+9977%3A2013>
- Villarante, K. I., Elegado, F. B., Iwatani, S., Zendo, T., Sonomoto, K., & de Guzman, E. E. (2011). Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 975-980. doi:10.1007/s11274-010-0541-1
- Yousef, A. E., Luchansky, J. B., Degan, A. J., & Doyle, M. P. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1461-1467. doi:10.1128/aem.57.5.1461-1467.1991
- Zhang, Y., Liu, R., & Wu, X. (2007). The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiology*, 57(4), 553-560. doi:10.1007/BF03175354

